

## 明 細 書

## 転写因子を利用した骨・軟骨再生用インプラント

## 5 技 術 分 野

本発明は、転写因子を利用したインプラントに関する。より詳しくは、転写因子の遺伝子を組み込んだウイルスベクターを生体内で徐放させ、転写因子活性を持続的に発現させることにより、良好な骨・軟骨再生を可能にするインプラントに関する。

10

背 景 技 術

骨は再生能力の限られた組織であり、その修復には自家骨の再移植や人工インプラントによる置換・補充が必要となる。しかし、自家骨の使用は患者の負担が大きく、その採取量にも限界がある。また、人工インプラントには、生体骨に匹敵するだけの強度や機械的特性、生体適合性が期待できないという問題がある。

これに対し、生体から取り出した自己の細胞を *in vitro* で培養・組織化して限りなく生体に近い組織を再構築し、これを再び生体内に戻すという再生医療の研究が進められている。この研究が実現すれば、それは損傷組織に対する最も理想的な治療方法となる。

再生医療においては、生体外で細胞をより早く目的の組織に増殖・分化させること、また移植組織を速やかに欠損部に融合・組織化させることが、重要な問題となる。これを解決する方法として、細胞の分化誘導をつかさどるサイトカイン(液性因子)を直接細胞に導入するいくつかの技術が知られている。たとえば、 $TGF-\beta 1$  を含浸させたコラーゲンスポンジ上で

骨髓細胞等を培養する技術（特開 2001-316285 号）、b F G F を含有するコ  
ラーゲン-軟骨細胞複合体による軟骨組織再生治療材（特開平 8-3199 号）  
等が公知である。しかし、増殖因子そのものを細胞に添加する方法では、  
添加した増殖因子が速やかに拡散してしまうため、増殖因子活性の十分な  
5 持続が望めないという問題がある。一方、リポフェクション法により増殖  
因子の遺伝子を細胞に導入する方法も試みられているが、この方法は樹立  
細胞株ではある程度の成功をおさめても、初代培養細胞に対しては殆ど 0  
に近い導入効率しか得られていない。

最近、骨芽細胞の分化には転写因子、特に runt 型及び  
10 Helix-Loop-Helix (HLH) 型の転写因子が重要な意味を持つことが、多くの研  
究者により明らかにされてきた。例えば runt 型転写因子としては、  
Pebp2alphaA (Pebp2  $\alpha$  A) /Cbfa1、HLH 型転写因子としては、Scleraxis、Id-1、  
I-mfa 等が骨芽細胞分化に重要な意味を持つことが報告されている  
（Komori, T. et al., (1997) Cell 89, p755-764; Acampora, D. et  
15 al., (1999) Development 126, p3795-3809; Tribioli, C. et al., (1999)  
Development 126, p5699-5711; Satokata, I. et al., (2000) Nature Genet.  
24, p391-395; Cserjesi, P. et al., (1995) Development 121, p1099-1110;  
Ng, L. J. et al., (1997) Dev. Biol. 183, p108-121)。

そして、発明者らは、この転写因子 (Cbfa1) 遺伝子を導入した骨芽細胞  
20 を  $\beta$ -TCP 等の生分解性材料を足場として培養、組織化し (H. Kojima,  
T. Uemura, (2002) Molecular Biology of the Cell, Vol. 13 supplement,  
p543a; Toshimasa Uemura, Hiroko Kojima, (2002) Tissue Engineering,  
Vol. 8, No. 6, p1129)、生体に移植することで、良好な骨・軟骨組織再生が  
可能になることを報告している（国際公開第 03/011343 号）。この方法は、  
25 効率の良い骨・軟骨再生を可能にするという点においては非常に優れた技

術である。しかし、患者体内からの細胞の単離、生体外での組織構築、生体内への再移植という工程は、現実の臨床適用においては決して容易ではない。

## 5 発明の開示

本発明は、整形外科領域及び歯科領域における、より簡便かつ安全な骨・軟骨再生の手段を提供することを目的とする。

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討し、 $\beta$ -TCPやハイドロキシアパタイト等の生体適合性材料を用いて生体内で転写因子の遺伝子導入用ウイルスベクターを徐放させる方法を見出した。そして、この方法によれば、低濃度のウイルスベクターでも転写因子の遺伝子を導入した細胞を移植する方法と同等の骨・軟骨再生が可能になることを実証し、本発明を完成させた。

すなわち、本発明は骨・軟骨誘導性転写因子の遺伝子を導入したアデノウイルスベクター又はレトロウイルスベクターを含む生体適合性材料からなる骨・軟骨再生用インプラントに関する。

本発明のインプラントにおいて、骨・軟骨誘導性転写因子としては、例えば、Cbfa1、Dlx-5、Bapx1、Msx2、Scleraxis 及び Sox-9 から選ばれる1種又は2種以上を利用することができる。なかでも、Cbfa1 が好ましい。

また、本発明のインプラントにおいて、生体適合性材料としては、例えば、ハイドロキシアパタイト、 $\alpha$ -TCP、 $\beta$ -TCP、コラーゲン、ポリ乳酸、ヒアルロン酸、及びポリグリコール酸、ならびにこれらの2種以上で構成される複合体から選ばれるいずれかを利用することができる。なかでも、 $\beta$ -TCP が好ましい。

本発明によれば、生体内で骨・軟骨再生を促す転写因子活性が長期的に

発現され、損傷を受けた骨・軟骨の良好な再生が可能になる。

以下、本発明について詳細に説明する。

本発明は、骨・軟骨誘導性転写因子の遺伝子を組み込んだウイルスベクターを含む生体適合性材料からなるインプラントに関する。該インプラントは、歯槽骨再生や大腿骨再生など、歯科領域及び整形外科領域における骨・軟骨再生に用いられる。

### 1. 転写因子

本発明に用いられる転写因子は、未分化の細胞を骨及び／又は軟骨に分化誘導する、骨・軟骨誘導性の転写因子であり、例えば Cbfa1、Dlx-5、Bapx1、Msx2、Scleraxis、Sox-9 が挙げられる。Cbfa1 は 1993 年京都大学の小川らによってクローニングされ、大阪大学の小守らにより間葉系幹細胞から骨芽細胞に分化誘導するのに必要不可欠であることが確認された転写因子である (Komori, T. et al., (1997) Cell 89, 755-764)。この Cbfa1 には 2 つのアイソフォーム、til-1 と pebp2  $\alpha$ A が存在する。Dlx-5 は、Drosophila distalless (Dll) 遺伝子の相同遺伝子で、軟骨骨膜や内膜の骨化に関わる転写因子である (Acampora, D. et al., (1999) Development 126, 3795-3809)。Bapx1 は、Drosophila bagpipe homeobox 遺伝子の相同遺伝子で、特に脊椎における間葉系幹細胞から軟骨細胞への分化に関わっており、Cbfa1 遺伝子の調節遺伝子の 1 つと考えられている (Tribioli, C. et al., (1999) Development 126, 5699-5711)。Msx2 は、Drosophila muscle segment homeobox (Msh) 遺伝子の相同遺伝子で頭蓋骨の骨化に関わっており、Cbfa1 遺伝子の調節遺伝子の 1 つと考えられている (Satokata, I. et al., (2000) Nature Genet. 24, 391-395)。Scleraxis は、間葉系幹細胞から軟骨細胞や結合組織への分化誘導に関わる転写因子である (Cserjesi, P. et al., (1995) Development 121, 1099-1110)。Sox-9 は、軟骨で発現してお

り、type II Collagen 等の軟骨分化に関わる遺伝子の発現調節をしている  
(Ng, L. J. et al., (1997) Dev. Biol. 183, 108-121)。

本発明で用いられる転写因子の由来は特に限定されないが、移植の対象  
となる哺乳動物に由来する転写因子を用いることが好ましい。したがって、  
5 ヒトを対象とした骨・軟骨再生においては、ヒト由来の転写因子を用いる  
ことが好ましく、マウスを対象とした骨・軟骨再生においては、マウス由  
来の転写因子を用いることが好ましい。

本明細書中において、前記 Cbfa1、Dlx-5、Bapx1、Msx2、Scleraxis、Sox-9  
等の骨・軟骨誘導性転写因子には、そのすべてのオーソログを含むものと  
10 する。ここで「オーソログ (Ortholog)」とはオーソログ遺伝子  
(orthologous gene) のことであり、進化的に同じ起源をもち構造と機能が  
類似した異なる種の遺伝子を意味する。これらの遺伝子の塩基配列は既  
に公知であり、GenBank 等の公共データベースよりその情報を入手するこ  
とができる。例えば、マウス骨芽細胞由来 Cbfa1 遺伝子の塩基配列は、  
15 Accession No. AF010284、AF005936 等として GenBank に登録されている。  
また、ヒト Cbfa1 の塩基配列は、Accession No. AH005498、NM004348、L40992  
等として、GenBank に登録されている。その他、ヒト Dlx-5 は Accession No.  
AK023493 として、ヒト Bapx1 は Accession No. NM\_001189 として、ヒト Msx2  
は Accession No. D31771 として、ヒト Scleraxis は Accession No. BK000280  
20 として、ヒト Sox-9 は Accession No. Z46629 として、それぞれ GenBank  
に登録されている。

本発明で用いられる骨・軟骨誘導性転写因子の遺伝子は、上記配列情報  
を利用して常法により調製することができる。すなわち、骨芽細胞から全  
RNA 又は mRNA を抽出し、公知の配列を基に作製したプライマーを用  
25 いて、PCR 法により目的とする転写因子の cDNA を増幅する。

## 2. ウイルスベクターの作製

前記アデノウイルス又はレトロウイルスベクターは、周知の方法に基づいて調製することができる。例えばアデノウイルスベクターは、Miyakeらの方法 (Miyake, S. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. 93:1320-1324, (1993)) に基づいて調製することができる。ベクターはまた、市販のキット、例えば Adenovirus Cre/loxP Kit (宝酒造社製) 等を用いて作製してもよい。このキットは、P1 ファージの Cre リコンビナーゼとその認識配列である loxP を用いた発現制御系 (Kanegae Y. et. al., 1995 Nucl. Acids Res. 23, 3816) による組換えアデノウイルスベクター作製用キットで、目的の転写因子遺伝子を組み込んだ組換えアデノウイルスベクターを簡便に作製することができる。なお、アデノウイルス感染の moi (multiplicity of infection) は、10 以上、好ましくは 50~200、より好ましくは 100 前後 (80~120 程度) である。

## 3. 生体適合性材料

本発明で用いられる生体適合性材料とは、生体内に適用可能な材料であれば特に限定されず、例えば、ハイドロキシアパタイト、 $\alpha$ -TCP、 $\beta$ -TCP、コラーゲン、ポリ乳酸、ヒアルロン酸、及びポリグリコール酸等を挙げることができる。これらの材料は1種類であってもよいし、あるいは2種以上を組み合わせた複合体であってもよい。

前記生体適合性材料は、ウイルスベクターの吸着が可能なように、有効吸着表面積が大きい多孔性 (または微粒子の集合体) であることが望ましい。なお、本明細書中において「多孔 (性)」とは、気孔率が少なくとも 30 % 以上であることを意味するものとする。本発明の生体適合性材料において気孔の大きさは特に限定されないが、直径 50  $\mu$ m ~ 500  $\mu$ m 程度であることが好ましい。一方、骨のような硬組織用インプラントでは、初

期強度も重要となる。セラミックス多孔体ではハイドロキシアパタイトや $\beta$ -TCPは強度が高く、本発明の生体適合性材料として好ましい。さらに、生体適合性材料は骨再生後に生体内で分解吸収されることがより好ましい。

- 5  $\beta$ -TCPはある程度の強度を有する生分解性セラミックス多孔体という点で、本発明にかかる生体適合性材料として特に好ましい。多孔性 $\beta$ -TCPの圧縮強度は3 Mパスカル程度で、生体骨（海綿骨で7 Mパスカル程度）よりは弱いものの、臨床使用には十分な強度といえる。さらに、 $\beta$ -TCPは生体内で徐々に分解してカルシウムイオンとリン酸イオンを放
- 10 出し、骨芽細胞によるハイドロキシアパタイト合成が容易な環境を実現する。すなわち、 $\beta$ -TCPから放出されたカルシウムイオンとリン酸イオンを利用して、周囲の骨芽細胞によるハイドロキシアパタイト合成が可能になる。合成されたハイドロキシアパタイトは骨の構成成分として、やがて硬い骨へと置換していく。実際、本発明のように転写因子の遺伝子を導
- 15 入したウイルスベクターを吸着させ、周囲が骨をつくるのに適した環境であれば、 $\beta$ -TCPの分解部位にハイドロキシアパタイトを主成分とした新生骨が容易に構成される。つまり、 $\beta$ -TCPはウィルスデリバリーの担体や骨形成の足場としてだけでなく、それ自体が骨新生を積極的に促進させる機能を有する。

#### 20 4. 生体適合性材料へのベクターの組み込み

- 生体適合性材料へのベクターの組み込み方法は特に限定されないが、できる限り均一に組み込まれることが好ましい。ベクターは前記生体適合性材料に化学的に結合されていてもよいし、単に物理的に吸着されているだけでもよい。例えば、 $\beta$ -TCPの場合であれば、ベクターを含む溶液（培
- 25 地）に浸漬させることにより、 $\beta$ -TCP中にベクターを均一に吸着させ

ることができる。必要であれば、ベクターを含む溶液が生体適合性材料内に十分いきわたるよう、適宜減圧してもよい。例えば、 $1 \times 10^8 \sim 10^9$  pfu/ml の濃度のウイルスベクター液を血清の含有されていない適当な溶媒（例えば、生理食塩水等）又は培地で希釈し、そこに生体適合性材料からなるブロックを浸漬する。100～150 mmHg に減圧してブロック内を脱気し、ブロック内にウイルスベクター液を十分浸透させる。

ベクターを吸着させた生体適合性材料は、好ましくは数時間以内に生体内に移植する。本発明の生体適合性材料は、生体内に埋入あるいは注入されると、骨再生に必要とされる期間にわたり、徐々に転写因子の遺伝子を導入したウイルスベクターを放出する。かくして、良好な骨再生が可能となる。

#### 5. その他

本発明のインプラントの形態及び形状は、特に限定されず、スポンジ、メッシュ、不織布状成形物、ディスク状、フィルム状、棒状、粒子状、及びペースト状等、任意の形態及び形状を用いることができる。また、本発明のインプラントは他の材料と混合して用いても良い。例えば、ウイルスを吸着させた  $\beta$ -TCP の顆粒をハイドロキシアパタイトの顆粒と混合して骨補填剤として使用することができる。こうした形態や形状は、インプラントの目的に応じて適宜選択すればよい。

本発明のインプラントは、その目的と効果を損なわない範囲において、骨・軟骨組織及び足場材料のほか、適宜他の成分を含んでいてもよい。そのような成分としては、例えば、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF)、血小板分化増殖因子 (PDGF)、インスリン、インスリン様増殖因子 (IGF)、肝細胞増殖因子 (HGF)、グリア誘導神経栄養因子 (GDNF)、神経栄養因子 (NF)、ホルモン、サイトカイン、骨形成因子 (BMP)、トランスフォーミング増殖



因子 (TGF)、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) 等の増殖因子、骨形成タンパク質、St、Mg、Ca 及び  $\text{CO}_3$  等の無機塩、クエン酸及びリン脂質等の有機物、薬剤等を挙げることができる。

本発明のインプラントは、骨親和性が高く、生体適用後すみやかに生体  
5 骨と一体化し、骨欠損部の再生を可能にする。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、ラット背上皮皮下移植実験の方法を示した模式図である。

図 2 は、ラット背上皮皮下移植実験におけるヘマトキシリン/エオジン染  
10 色像（移植後 3 週目、背上皮皮下）を示す写真である。

図 3 は、ラット大腿骨欠損部位移植実験の方法を示す模式図である。

図 4 は、ラット大腿骨欠損部位移植実験におけるヘマトキシリン-エオ  
ジン染色像（移植後 2 週目、 $\beta$ -TCP ブロック）を示す写真である。

図 5 は、ラット大腿骨欠損部位移植実験におけるヘマトキシリン-エオ  
15 ジン染色像（移植後 6 週目、 $\beta$ -TCP ブロック）を示す写真である。

図 6 は、ラット大腿骨欠損部位移植実験におけるヘマトキシリン-エオ  
ジン染色像（移植後 3 週目、HA ブロック）を示す写真である。

図 7 は、ラット大腿骨欠損部位移植後の  $\beta$ -TCP ブロックと HA ブロック  
のヘマトキシリン-エオジン染色像（移植後 3 週目）を示す写真である。

図 8 は、ラット大腿骨欠損部位移植後のウィルス吸着ブロックとウィル  
20 ス感染細胞吸着ブロックのヘマトキシリン-エオジン染色像（移植後 8 週  
目、 $\beta$ -TCP ブロック）を示す写真である。

図 9 は、ラット背上皮皮下移植実験におけるヘマトキシリン-エオジン  
25 染色像（移植後 20 日および 8 週目、OPLA コンポジット）を示す写真であ  
る。

図 1 0 は、ラット背上皮皮下移植実験におけるオステオカルシン免疫染色像（移植後 20 日目、OPLA コンボジット）を示す写真である。

図 1 1 は、ラット大腿骨欠損部位移植実験におけるヘマトキシリン－エオジン染色像（移植後 10 日および 20 日目、OPLA コンボジット）を示す写真である。

図 1 2 は、ラット大腿骨欠損部位移植実験におけるヘマトキシリン－エオジン染色像（移植後 3 週目、OPLA コンボジット）を示す写真である。

本明細書は、本願の優先権の基礎である特願 2 0 0 3－3 5 5 5 0 5 号  
10 の明細書に記載された内容を包含する。

#### 発明を実施するための最良の形態

実施例 1：生体適合性材料を担体としたウイルスベクターの徐放研究 (1)  
 $\beta$ -TCP ブロックおよび HA ブロック

##### 15 1. アデノウイルスベクターの作製

マウスの骨芽細胞から単離した Total RNA から AMV reverse transcriptase を用いて cDNA を合成し、これを鋳型として Cbfa1 の cDNA (GenBank Accession No. AF010284：配列番号 1) に特異的なプライマーを用いて PCR により cbfa1 cDNA を増幅して得た。

20 sense primer 5'-ATGCTTCATTCGCCTCACAAAC-3' (配列番号 2)

antisense primer 5'-TCTGTTTGGCGGCCATATTGA-3' (配列番号 3)

Cbfa1 cDNA は TA cloning vector (Invitrogen, pCR II-TOPO) にクローニングして大量調製した。Cbfa1 cDNA を制限酵素の Spe I と EcoR V で切り出し、平滑末端化した後、Adenovirus Cre/loxP kit (宝酒造, 6151) を  
25 用いてコスミドベクター pAxCALNLw の Sma I サイトに挿入し、Kit の説明書

に従って組換えアデノウイルスを作製した。作製したウイルスの力価は、約  $10^{11}$  PFU/ml の値を示し、感染効率は非常に高いことが確認された。

## 2. 骨芽細胞の採取及び培養方法

Rat Bone Marrow Osteoblast (RBM0) は、6 週齢の Fisher ラット (雄) の大腿骨より Maniatopoulos らの方法 (Maniatopoulos, C., Sodek, J., and Melcher, A. H. (1988) *Cell Tissue Res.* 254, 317-330) に従って採取した。細胞は、15% FBS (Sigma, F-9423)、Antibiotic-Antimycotic (GIBCO BRL, 15240-062) 添加 MEM 培地 (nacalai tesque, 214-42) で約 1 週間培養した。その後 2 日間 10 nM Dexamethasone、10mM  $\beta$ -glycerophosphate、5  $\mu$ g/ml vitamin C phosphate を添加した上記の培地で培養した。

## 3. ラット生体内移植実験

### 3. 1 ラット背上皮皮下移植実験

Cbfa1 と Cre リコンビナーゼ遺伝子の組換えアデノウイルス混合液 ( $1 \times 10^9$  pfu/ml) に  $\beta$ -TCP ブロック (Olympus, 2 mm $\times$ 2 mm $\times$ 2 mm) を 3 時間浸漬した。RBM0 をトリプシン処理して剥がした後、細胞濃度を 100 万個/ml に調整して減圧下 (100mHg) でブロックに吸着した。ラットの背上皮皮下にウイルス吸着ブロックあるいは未処理のブロックを移植した。3 週間後に摘出したブロックをヘマトキシリン/エオジン染色して観察した。図 1 にラット背上皮皮下移植実験の概要を示す。

### 3. 2 ラット大腿骨欠損部位移植実験

1) Cbfa1 と Cre リコンビナーゼ遺伝子の組換えアデノウイルス混合液 ( $1 \times 10^9$  pfu/ml) に  $\beta$ -TCP ブロック (Olympus, 2 mm $\times$ 2 mm $\times$ 2 mm)、あるいはハイドロキシアパタイト (HA) ブロック (インターポア、2 mm $\times$ 2 mm $\times$ 2 mm) を 3 時間浸漬した。ラットの大腿骨にドリルで 2.5 mm 立方の穴を開けて欠損部位を作製し、そこにブロックを移植した。数週間後に摘出したウ

ウイルス吸着ブロックあるいは未処理のブロックをヘマトキシリン／エオジン染色して観察した。

2) Cbfa1 と Cre リコンビナーゼ遺伝子の組換えアデノウイルス混合液 ( $1 \times 10^9$  pfu/ml) に  $\beta$ -TCP ブロック (Olympus, 2 mm $\times$ 2 mm $\times$ 2 mm)、あるいは  
5 はハイドロキシアパタイト (HA) ブロック (インターポア、2 mm $\times$ 2 mm $\times$ 2 mm) を 3 時間浸漬した。RBM0 をトリプシン処理して剥がした後、細胞濃度を 100 万個/ml に調整して減圧下 (100mHg) でブロックに吸着した。ラットの大腿骨にドリルで 2.5 mm 立方の穴を開けて欠損部位を作製し、そこに  
10 ウイルス吸着ブロックあるいは未処理のブロックを移植した。数週間後に摘出したブロックをヘマトキシリン／エオジン染色して観察した。図 3 にラット大腿骨欠損部位移植実験の概要を示す。

#### 4. 組織切片作製、染色法

摘出したブロックを 4% paraformaldehyde, 0.05% glutaraldehyde でマイクロウェーブ固定し、翌日 10% EDTA, 100 mM Tris (pH7.4) 中で約 1 週間脱灰した。脱灰後、エタノールで脱水し、パラフィンに包埋した。5  $\mu$ m  
15 の厚さの切片を作製し、脱パラフィン後、ヘマトキシリン続いてエオジンで染色した。

結果：

##### 1. ラット背上皮皮下移植実験結果

20 図 2 に、背上皮皮下移植 3 週間後のヘマトキシリン／エオジン染色結果を示す。ウイルス吸着ブロックの方はブロックの中心部分で (図 2 右上、右下) 骨が再生されている様子が観察できた。一方未処理のブロックの方では骨芽細胞様細胞は観察されるが骨化は進行していなかった (図 2 左下)。

##### 2. ラット大腿骨欠損部位移植実験結果

25 1)  $\beta$ -TCP ブロック (移植後 2 週間)

図 4 に、 $\beta$ -TCP ブロック大腿骨欠損部位移植 2 週間後のヘマトキシリン/エオジン染色結果を示す。Cbfa1 遺伝子組み換えウイルス吸着ブロックの方が、ブロックのポアの溶解が進行しており、ポアの周囲の骨化も進行していることが観察された（図 4 左下、右下）。骨芽細胞を添加した方は添加  
5 していないものに比べて、若干ブロックの溶解及び骨化が進んでいるように見えた（図 4 右下）。Cbfa1 遺伝子組み換えウイルスを吸着することで、骨再生を迅速に誘導できることが確認された。

## 2) $\beta$ -TCP ブロック（移植後 6 週間）

図 5 に、 $\beta$ -TCP ブロック大腿骨欠損部位移植 6 週間後のヘマトキシリン/エオジン染色結果を示す。Cbfa1 遺伝子組み換えウイルス吸着ブロックの方がブロックの溶解が進行しており、また骨化の進行も顕著であった。特に皮質骨部位における迅速な骨再生と、骨髓腔における速やかなブロックの消失が観察された（図 5 左下、右下）。骨芽細胞を添加した方が、骨・骨  
10 髄再生の進行状況から判断して、Cbfa1 遺伝子の導入効果が若干強く現れることが観察できた（図 5 右下）。

## 3) HA ブロック（移植後 3 週間）

図 6 に、HA ブロック大腿骨欠損部位移植 6 週間後のヘマトキシリン/エオジン染色結果を示す。 $\beta$ -TCP ブロックに比べて本実験で用いた HA ブロックは、ポアサイズも気孔率も非常に高く、ウイルスの吸着する表面積が  
20 小さくなるため、ウイルス吸着の影響が顕著ではない。また HA は生分解性材料ではないため、欠損が修復された後も体内に残存し続けると考えられた。

## 4) $\beta$ -TCP ブロックと HA ブロックの比較（移植後 3 週間）

図 7 に、移植後 3 週間で摘出した HA ブロックと  $\beta$ -TCP ブロックの骨再生の様子を比較した結果を示す。HA ブロックに比べて生分解性のセラミッ  
25

クス材料である多孔性  $\beta$ -TCP ブロックの方が、骨・骨髄再生を促進させることがわかった。効果は特に皮質骨部分で顕著に認められる。 $\beta$ -TCP ブロックの場合、移植後ウイルスが生体内で徐々に拡散されるため、ブロック周囲に存在する骨髄にも影響を与えて骨再生を促すものと考えられた。

- 5    5) ウィルス吸着ブロックとウィルス感染細胞吸着ブロックの比較（移植後 8 週間、 $\beta$ -TCP ブロック）

図 8 に、移植後 8 週間で摘出したウィルス吸着ブロックとウィルス感染細胞吸着ブロックの骨再生の様子を比較した結果を示す。ウィルス感染細胞吸着ブロックに比べてウィルス吸着ブロックは、骨髄腔のブロックの溶解、骨髄への置換は若干劣るが、皮質骨部分の骨化の進行は同等、及びそれ以上に早いことが観察された。

考察：

生体適合性材料である多孔性  $\beta$ -TCP 及びハイドロキシアパタイト (HA) に Cbfa1 の cDNA を組み込んだウイルスベクターを吸着させ、生体内に移植して Cbfa1 遺伝子組み換えウイルスを徐放させることにより、骨・骨髄再生が促進できることが確認された。また、骨・骨髄再生の進行状況から判断して、Cbfa1 遺伝子導入用ウイルスベクターを吸着させた  $\beta$ -TCP ブロックは、Cbfa1 遺伝子を導入した骨芽細胞を吸着させた  $\beta$ -TCP ブロックと同等の骨再生効果を有すると考えられた。

- 20    HA ブロックは  $\beta$ -TCP ブロックに比べてポアサイズも気孔率も非常に高く、結果的にウイルスが吸着する表面積が小さいと考えられる。そのためウイルス吸着の影響が  $\beta$ -TCP ブロックほど顕著には確認できなかった。しかしながら、HA ブロックの染色像で皮質骨の部分に着目すると、ウイルス吸着担体の方がより良好に骨再生が促進されていることがわかる。 $\beta$ -TCP  
25    とは異なり、HA は生分解性材料ではないため、欠損が修復された後も体内

に残存し続けるという問題はあるものの、本発明のインプラント材料として使用しうることが確認された。

ラットのようなげっ歯類は一般にアデノウイルスに感染しにくいと、ヒトの十倍以上の濃度を使用する必要があるといわれている。例えば、直接体内へ導入する場合、 $10^8$  から  $10^{10}$  pfu のウイルスを注射するという (Okubo et al., *Life Science* (2001) vol 70 (3): 325-36, Trudel et al., *Cancer Gene Therapy* (2003), vol 10 (10): 755-763, Hedman et al., *Circulation* (2003), vol 107 (21): 2677-2683)。本実施例では、 $10^9$  pfu/ml のウイルス液 1 ml に 2 mm 立方のブロックを 10~20 個程度浸漬しているため、体内に導入されるウイルス量は  $10^9$  pfu よりさらに少ない。また、本発明の方法では、注射等による直接導入と異なり、ウイルスはブロックに吸着されているため、生体内移植後に血流に乗って拡散する可能性も低い。すなわち、本試験により、本発明の方法はより低濃度で効果的な骨軟骨再生を可能にすることが確認された。

15

実施例 2：生体適合性材料を担体としたウイルスベクターの徐放研究 (2)  
OPLA コンボジット

#### 1. アデノウイルスベクターの作製

マウスの骨芽細胞から単離した Total RNA から AMV reverse transcriptase を用いて cDNA を合成し、これを鋳型として Cbfa1 の cDNA に特異的なプライマー sense primer 5' -ATGCTTCATTCGCCTCACAAAC-3' (配列番号 2) と antisense primer 5' -TCTGTTTGGCGGCCATATTGA-3' (配列番号 3) を用いて PCR により cbfa1 cDNA (GenBank Accession Number AF010284) を増幅し、シーケンスにより配列を確認した。Cbfa1 cDNA は TA cloning vector (pCR II-TOPO, provided by invitrogen) にクローニングして大量

25

調製した。Cbfa1 cDNA を制限酵素 Spe I および EcoR V で切り出し、平滑末端化した。

マウス VEGF の cDNA (GenBank Accession Number NM\_009505) は、東京工業大学 渡辺氏より供与を受けた。VEGF cDNA を大量調製し、制限酵素の  
5 EcoRI で切り出した後、平滑末端化した。Cbfa1 cDNA あるいは VEGF cDNA は Adenovirus Cre/loxP kit (宝酒造, #6151) を用いてコスミドベクター pAxCALNLw の Sma I サイトに挿入し、Kit の説明書に従って組換えアデノウイルス (Adv-Cbfa1) を作製した。作製したウイルスの力価は、それぞれ約  $10^{11}$  PFU/ml、約  $2.5 \times 10^9$  PFU/ml と、非常に高い感染効率であった。これら  
10 のウイルスは E1 領域欠失のため、標的細胞内では増殖することはできず、一過性の性質をもつ。また、目的遺伝子上流にスタッパーをもつため、Cre リコンビナーゼ発現ウイルスと共感染のときのみ遺伝子を発現する。Cre リコンビナーゼ発現アデノウイルス (Adv-cre) はキットに付属されていたものを用いた。

## 15 2. ラット生体内移植実験

担体として BD 3D OPLA コンポジット (BD Falcon, #354614,  $5\text{mm} \times 3\text{mm} \times 0.039\text{cm}^2$ ) を用い、生体内移植実験を行った。BD 3D OPLA (Open-Cell Polylactic Acid) コンポジットは、D、D-L、L ポリ乳酸から合成された合成ポリマーコンポジットで、高密度懸濁細胞の培養に効率的な多面体構造  
20 を有している。

### 2. 1 ラット背上皮皮下移植実験

OPLA コンポジットは、Adv-Cbfa1 と Adv-cre の組換えアデノウイルス混合液 ( $1 \times 10^9$  pfu/ml) に減圧下で脱気しながら 2 分間浸漬し、その後 3 時間以上静置した。ウイルス液を吸着させた OPLA コンポジットはラットの背  
25 上皮下に移植した。ウイルス吸着 OPLA コンポジットあるいは未処理の



OPLA コンポジットは数週間後に摘出して解析した。

## 2. 2 ラット大腿骨欠損部位移植実験

骨補填材料として上記 BD 3D OPLA コンポジット (BD Falcon, #354614、  
5mm×3mm×0.039cm<sup>2</sup>) を用いた。滅菌下で四等分した OPLA コンポジットを  
5 Cbfa1 (Adv-Cbfa1) あるいは VEGF (Adv-VEGF) と Cre リコンビナーゼ遺伝  
子 (Adv-cre) の組換えアデノウィルス混合液 (1×10<sup>9</sup> pfu/ml) に減圧下  
で脱気しながら 2 分間浸漬し、その後 3 時間以上静置した。ラットの大腿  
骨に直径 2.5mm、深さ 2mm の穴をドリルで開けて欠損部位を作製し、ウィ  
ルス液を吸着させた OPLA コンポジットをそこに移植した。ウィルス吸着  
10 OPLA コンポジットあるいは未処理の OPLA コンポジットは数週間後に摘出  
して解析した。

## 3. 組織切片作製、染色法

摘出したコンポジットを 4% paraformaldehyde, 0.05% glutaraldehyde  
でマイクロウェーブ固定した後、翌日 10% EDTA, 100 mM Tris (pH7.4) 中  
15 で約 1 週間脱灰した。脱灰後、エタノールで脱水し、レモゾールで透徹し、  
パラフィンに包埋した。5μm の厚さで切片を作製し、脱パラフィン後、ヘ  
マトキシリン続いてエオジンで染色した。サンプルは光学顕微鏡 (IX-70,  
Olympus, Tokyo, Japan) で観察し、CCD カメラ (CoolSNAP cf, ROPER  
Scientific) により取り込んだデジタルイメージは MetaMorph software で  
20 解析した。

免疫染色については、5μm の厚さで切片を作製し、脱パラフィン後、  
Proteinase K solution (DakoCytomation, Inc., Glostrup, Denmark) で 5  
分間処理し、続いて Peroxidase Blocking Reagent (DakoCytomation) で処  
理した。切片を Blocking reagent (Roche, Basel, Switzerland) で非特異  
25 的蛋白質の吸着をブロッキングし、一次抗体の mouse monoclonal

anti-osteocalcin antibody (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA) と一晚、4℃でインキュベートした。二次抗体の Horseradish peroxidase conjugated secondary antibody (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ) を加えて一時間インキュベートし、DAKO Liquid DAB substrate-chromogen (DakoCytomation) を用いて発色させた。その後、ヘマトキシリンで核染色した。サンプルは光学顕微鏡 (IX-70, Olympus, Tokyo, Japan) で観察し、CCD カメラ (CoolSNAP cf, ROPER Scientific) により取り込んだデジタルイメージは MetaMorph software で解析した。

結果：

#### 10 1. ラット背上皮皮下移植実験結果

図 9 に、ヘマトキシリン-エオジン染色像の観察結果（移植後 20 日および 8 週目）を示す。Adv-Cbfa1 ウィルス吸着コンボジットの方は骨が再生されている様子が観察できる（写真右側、矢印）。一方コントロールのコンボジットの方は、皮下の脂肪等の細胞が浸潤してきている様子は観察されるが骨化は進行していない（写真左側、\*印）。

図 10 に、オステオカルシン免疫染色像の観察結果（移植後 20 日目）を示す。オステオカルシンはポアの表面に接着している細胞で強く発現しており、石灰化が生じている部位でも観察された。オステオカルシンの局在は石灰化が生じており、骨が再生されていることを示している（写真、矢印）。

#### 2. ラット大腿骨欠損部位移植実験結果

図 11 に、ヘマトキシリン-エオジン染色像の観察結果（移植後 10 日および 20 日目）を示す。Adv-Cbfa1 ウィルス吸着コンボジットの方が、皮質骨の部分の骨再生が進行しており、皮質骨の欠損部位の大きさが小さくなってきている様子が観察された（写真上段）。また移植後 20 日目のサンプ

ルでは、移植したコンポジットの溶解および順調な骨再生が観察され、さらに移植したコンポジットと皮質骨の融合が観察できた(写真下段、右側)。一方、ウィルスを吸着していないコンポジット(コントロール)では、移植後 10 日目では骨再生がほとんど観察されず、20 日目でもコンポジットと皮質骨との融合も顕著ではない。これらの結果は、Adv-Cbfa1 ウィルス吸着コンポジットでは、移植期間中に生体内で Adv-Cbfa1 が徐々に溶け出して周囲の細胞に働きかけ、活性化することにより迅速な骨再生を誘導できることを示唆する。

図 1 2 に、ヘマトキシリン-エオジン染色像の観察結果(移植後 3 週目)を示す。Adv-Cbfa1 ウィルスおよび Adv-VEGF ウィルス吸着コンポジットでは、移植したコンポジットの溶解が顕著であり、コンポジット内部の骨再生が進行している様子が観察された(写真下段)。特に、皮質骨部位における迅速な骨再生、および移植したコンポジットと皮質骨の融合が観察された(写真下段)。

以上より、本発明の方法は OPLA コンポジットを徐放性担体として用いた場合にも、効果的な骨軟骨再生を可能にすることが確認された。

本明細書中で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書中にとり入れるものとする。

20

#### 産業上の利用の可能性

本発明によれば、より安全かつ簡便な骨・軟骨再生が可能となる。本発明のインプラントは、歯科領域あるいは整形外科領域における安全かつ簡便な骨・軟骨再生手段として利用できる。

25

配列表フリーテキスト

配列番号 2－人工配列の説明：Cbfa1 増幅用センスプライマー

配列番号 3－人工配列の説明：Cbfa1 増幅用アンチセンスプライマー

## 請 求 の 範 囲

1. 骨・軟骨誘導性転写因子の遺伝子を導入したアデノウイルスベクター又はレトロウイルスベクターを含む生体適合性材料からなるインプラント。  
5
2. 骨・軟骨誘導性転写因子が、Cbfa1、Dlx-5、Bapx1、Msx2、Scleraxis 及び Sox-9 からなる群より選ばれる 1 種又は 2 種以上である、請求項 1 に記載のインプラント。
3. 骨・軟骨誘導性転写因子が Cbfa1 である、請求項 1 に記載のインプラント。  
10
4. 生体適合性材料が、ハイドロキシアパタイト、 $\alpha$ -TCP、 $\beta$ -TCP、コラーゲン、ポリ乳酸、ヒアルロン酸、及びポリグリコール酸、ならびにこれらの 2 種以上で構成される複合体からなる群より選ばれるいずれかである、請求項 1～3 項のいずれか 1 項に記載のインプラント。
- 15 5. 生体適合性材料が  $\beta$ -TCP である、請求項 4 に記載のインプラント。

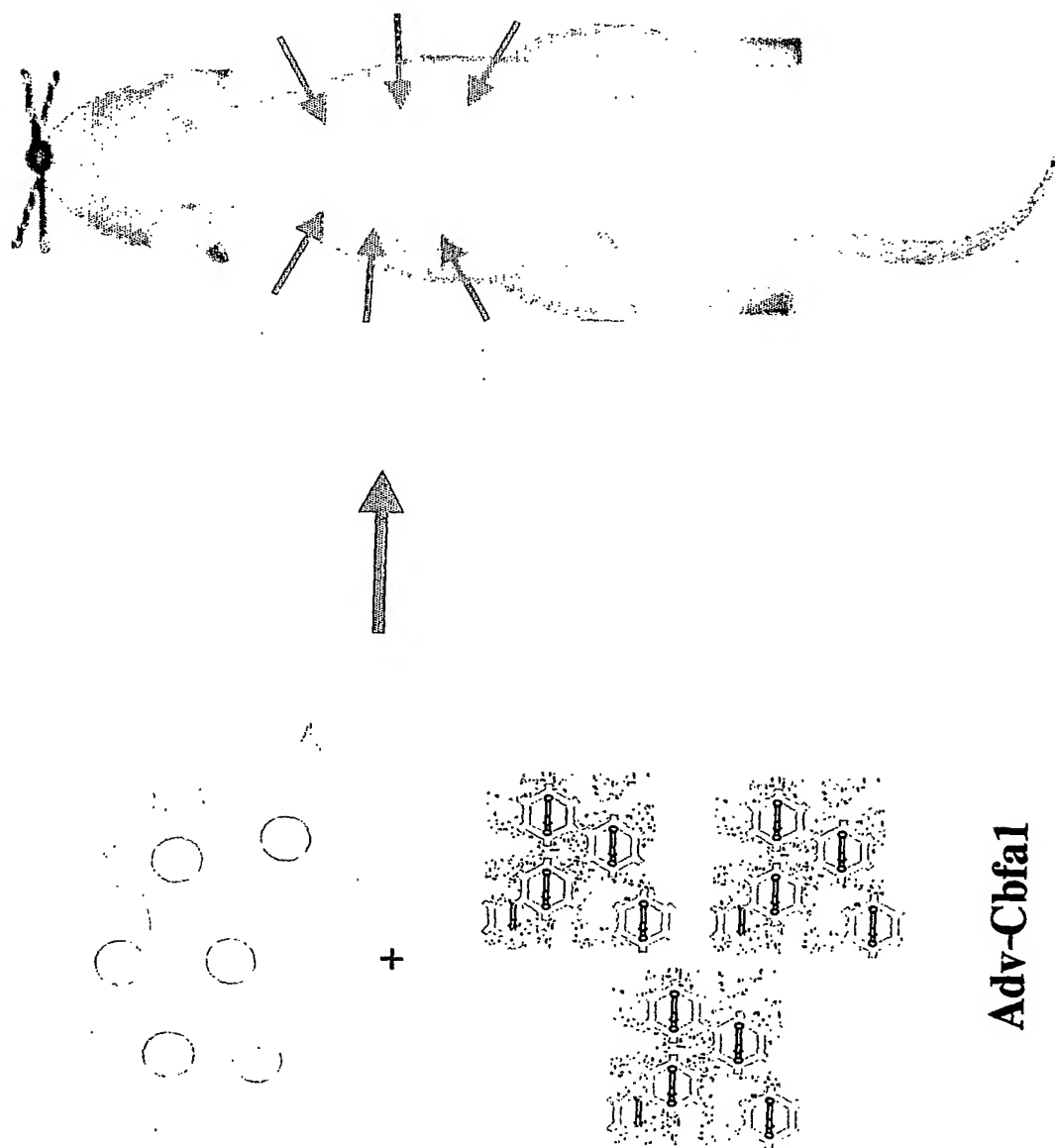
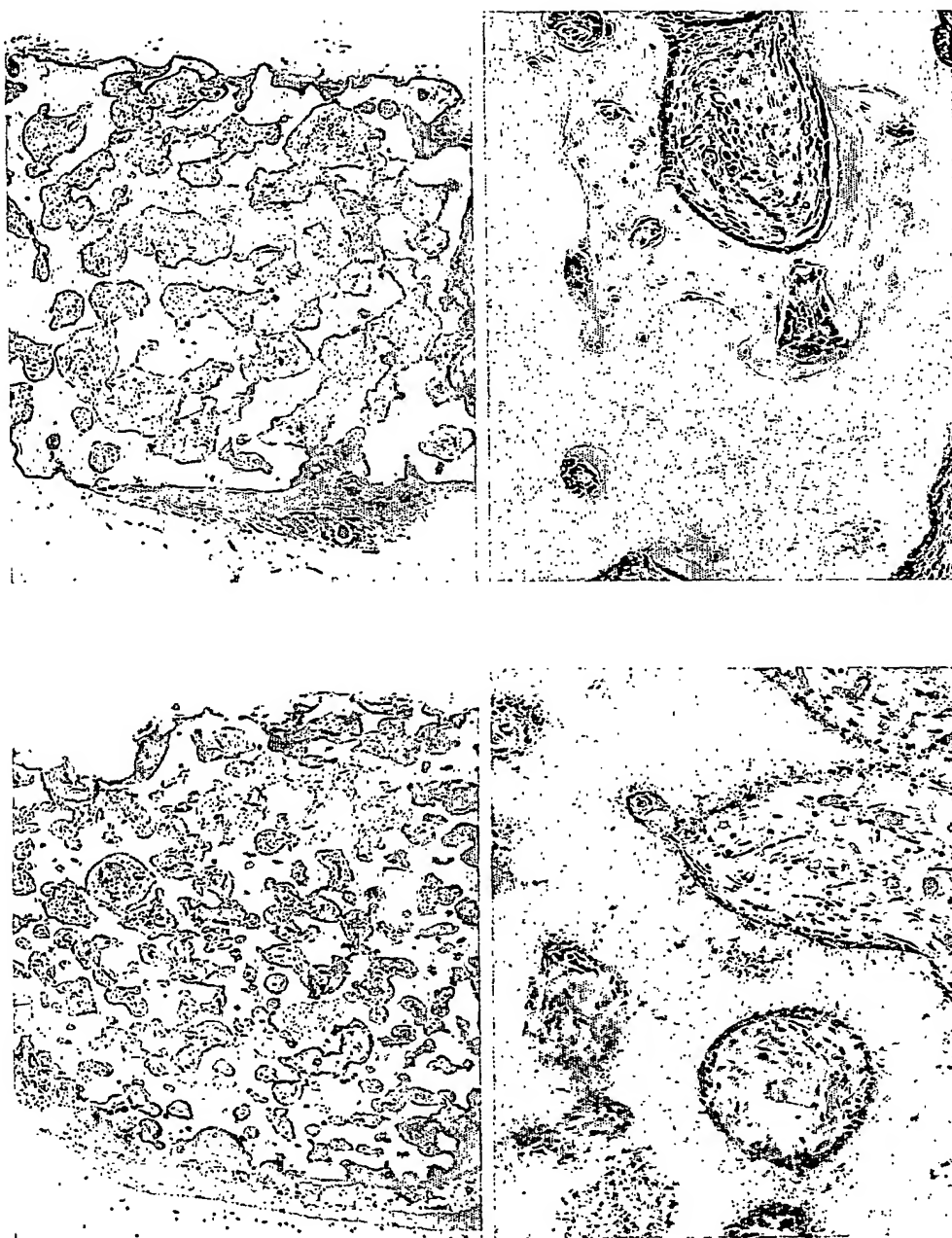
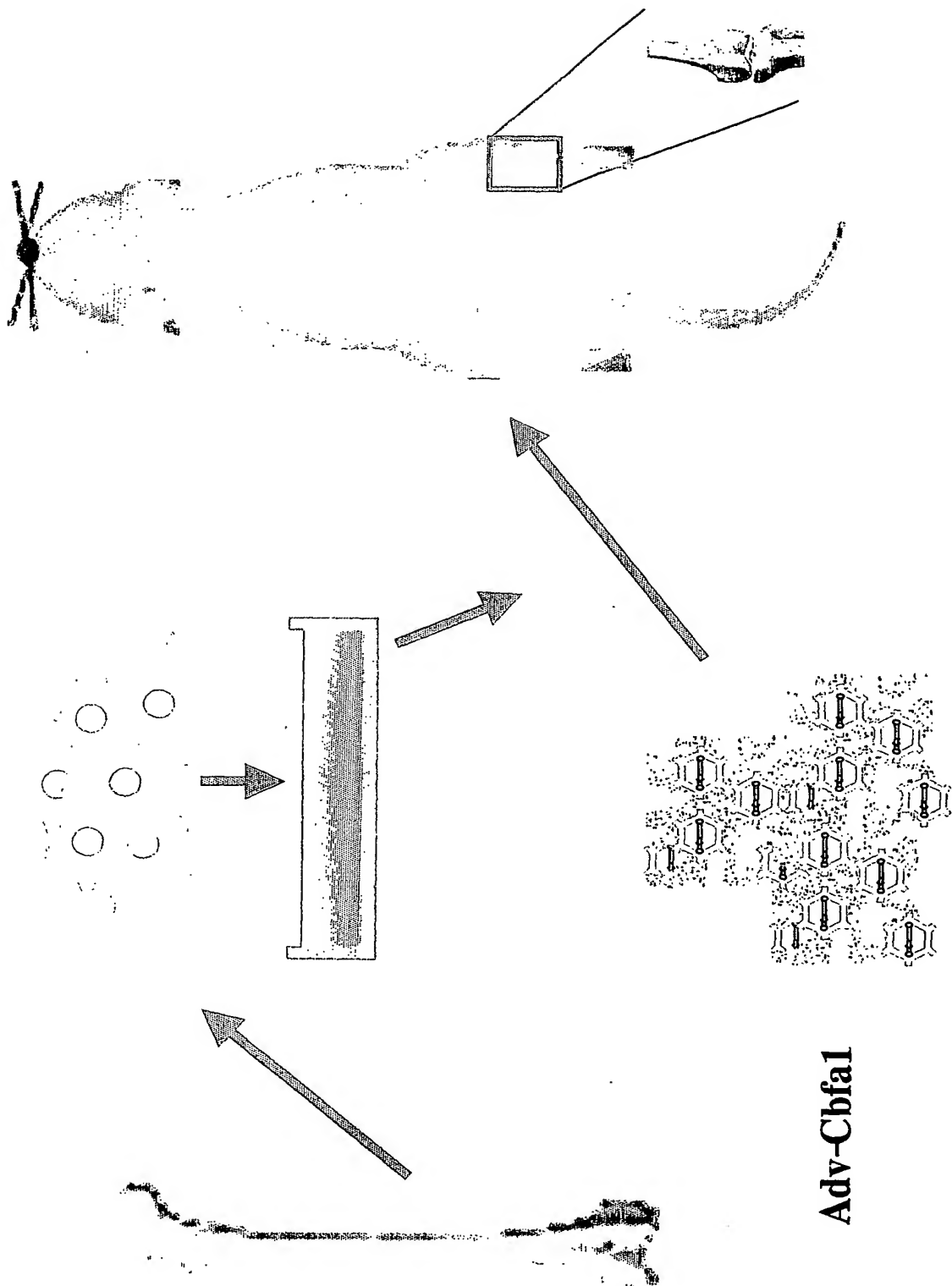


図 2



Adv-Cbfa1

Control





4

**Control**



**Adv-Cbfa1**



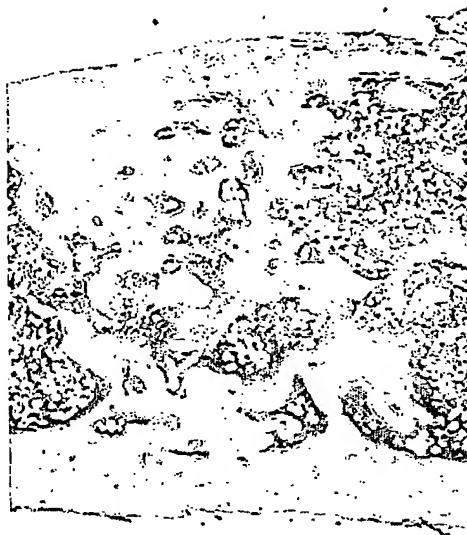
**Without RBMO**

**With RBMO**

5

Control

Adv-Cbfa



With RBMO

Without RBMO

6

Control



Adv-Cbfa1



Without RBMO



With RBMO

7



Control



HA block



Adv-Cbfa



$\beta$ -TCP block

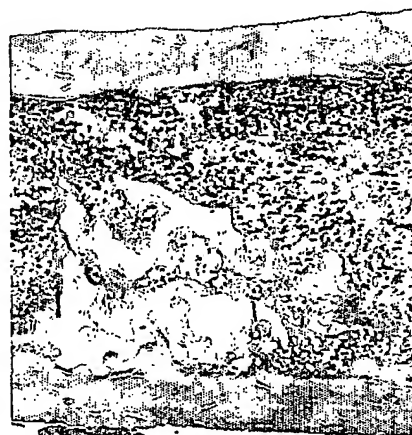
8

A

Control



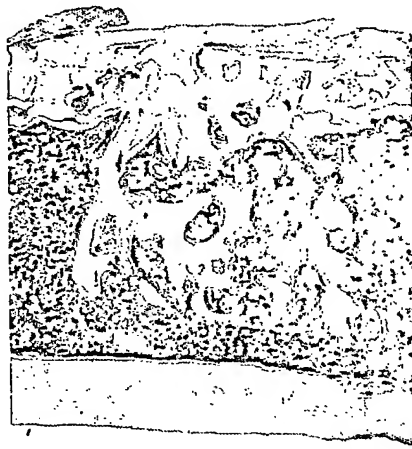
Adv-Cbfa1



Without RBMO

B

Control



Adv-Cbfa1



With RBMO

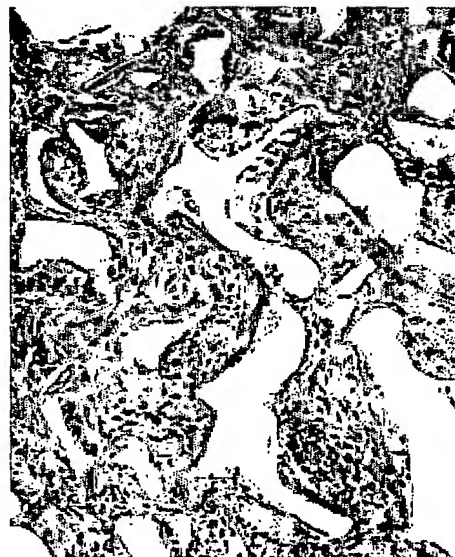
9

20 days

8 weeks

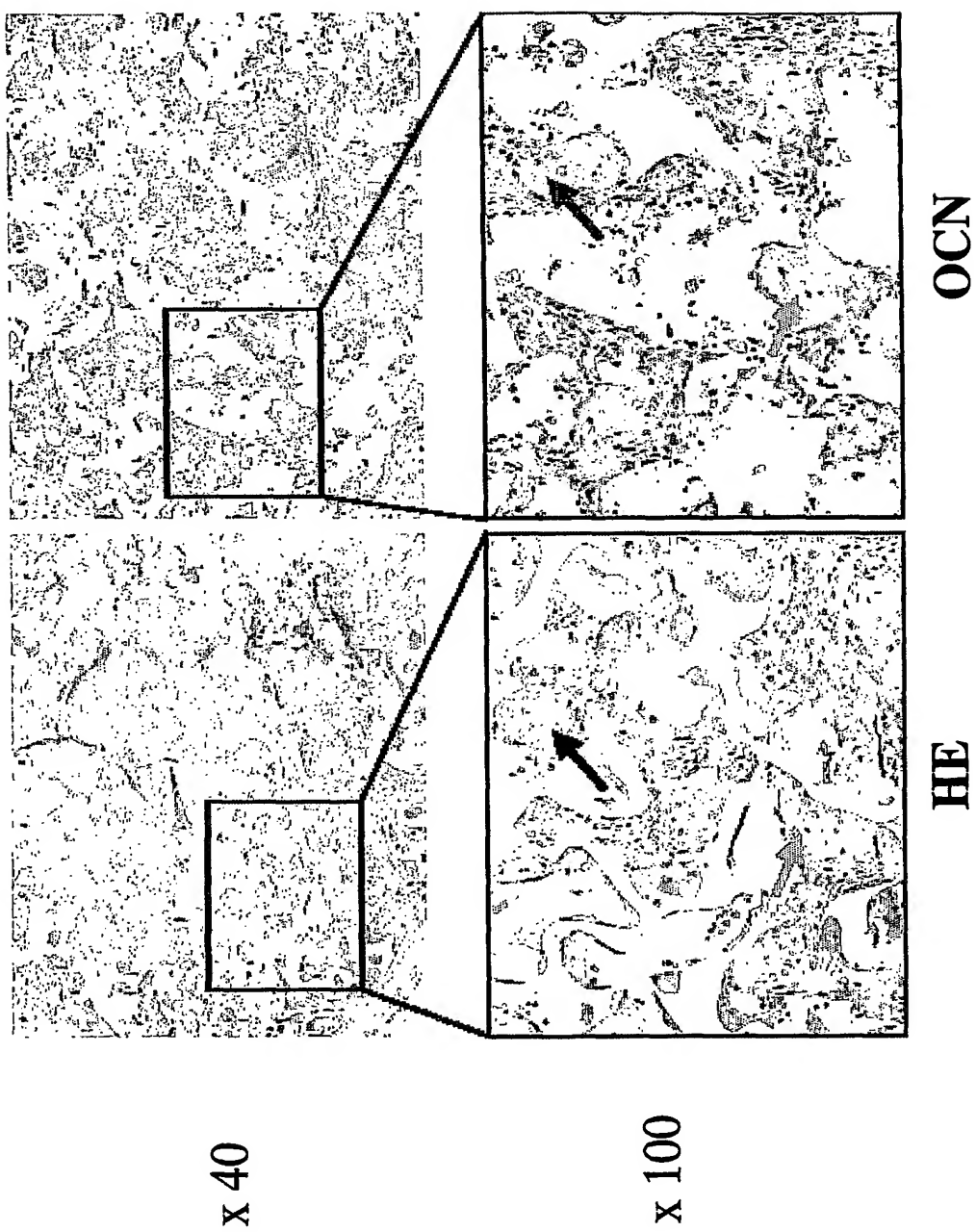


Adv-Cbfa1



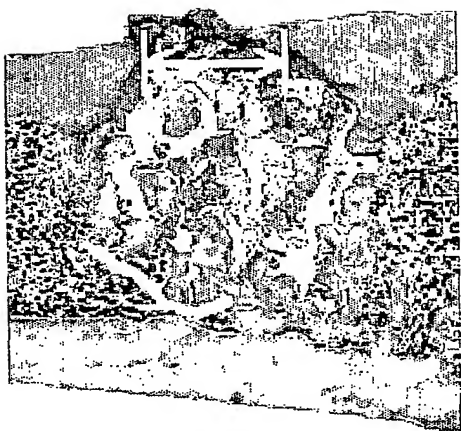
Control

FIG 10

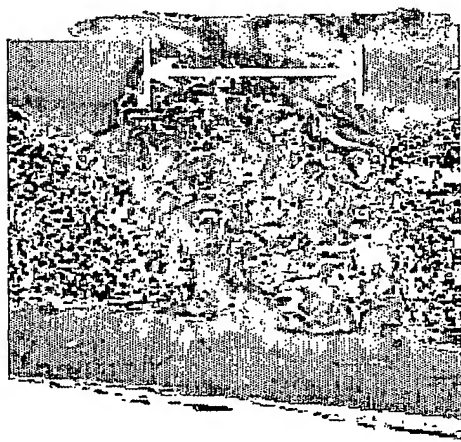




111



Adv-Cbfa1



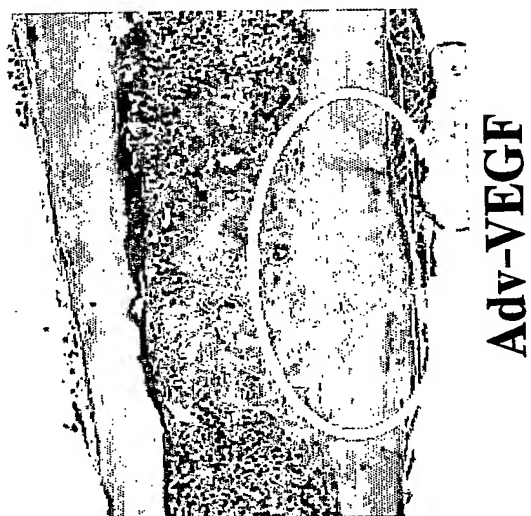
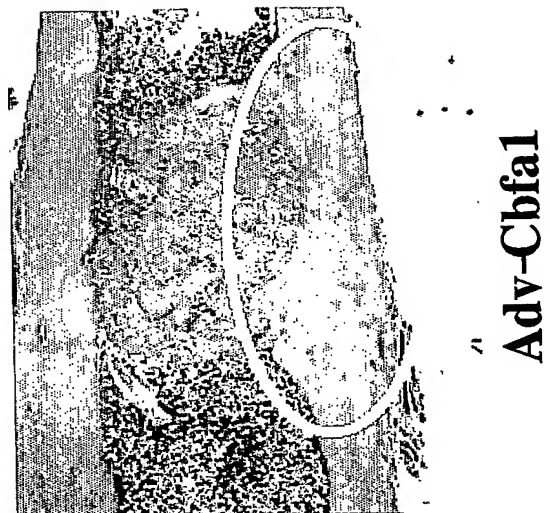
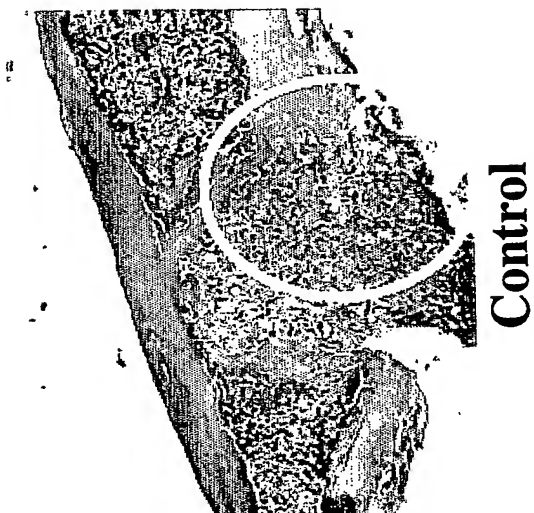
Control

10 days

20 days



図 12



## SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Agency

National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

<120> Implant for regeneration of bone/cartilage tissue by using transcription factor

<130> PH-2275-PCT

<150> JP 2003-355505

<151> 2003-10-15

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1791

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<400> 1

atgcttcatt cgcctcacia acaaccacag aaccacaagt gcggtgcaaa ctttctccag 60  
gaagactgca agaaggtctt ggcggtttaa tgggttaatct ctgcaggtca ctaccagcca 120  
ccgagaccaa ccgagtcatt taaggctgca agcagtatatt acaacagagg gcacaagttc 180  
tatctggaaa aaaaaggagg gactatggcg tcaaacagcc tcttcagcgc agtgacaccg 240  
tgtcagcaaa gcttcttttg ggatccgagc accagccggc gcttcagccc cccctccagc 300

agcctgcagc cggcaagat gagcgacgtg agcccgggtg tggctgcgca gcagcagcaa 360  
 cagcagcagc agcagcagca acagcagcag caacaacagc aacagcaaca acagcagcag 420  
 cagcagcagc agcaggaggc ggccgcagca gcagcggcgg cagcggcggc ggacagcagc 480  
 gcggcggccg cagtgcctcg attgaggccg ccgcacgaca accgcaccat ggtggagatc 540  
 atcggcgacc acccggccga actgggtccg accgacagtc ccaacttcct gtgctccgtg 600  
 ctgcctcgc actggcggtg caacaagacc ctgcccgtgg cttcaaggt ttagccctc 660  
 ggagaggtac cagatgggac tgtgggtacc gtcatggccg ggaatgatga gaactactcc 720  
 gccgagctcc gaaatgcctc cgtgttatg aaaaaccaag tagccaggtt caacgatctg 780  
 agatttgttg gccggagcgg acgaggcaag agtttcacct tgaccataac agtcttcaca 840  
 aatcctcccc aagtggccac ttaccacaga gctattaaag tgacagtga cgggtccccg 900  
 gaaccaagaa ggcacagaca gaagcttgat gactctaaac ctagtttgtt ctctgatcgc 960  
 ctcatgtatt tagggcgcat tctcatccc agtatgagag taggtgtccc gcctcagaac 1020  
 ccacggccct ccctgaactc tgcaccaagt ctttttaac cacaaggaca gattcagatt 1080  
 acagatccca ggcaggcaca gtcttccca ccgtggctct atgaccagtc ttaccctcc 1140  
 tatctgagcc agatgacatc cccatccatc cactccacca cgccgctgtc ttccacacgg 1200  
 ggcaccgggc tacctgcat cactgacgtg ccaggcgta ttccagatga tgacactgcc 1260  
 acctctgact tctgcctctg gccttcctct ctcatgaaga agagccaggc aggtgttca 1320  
 gaactgggcc ctttttcaga cccaggcag ttccaagca ttctatccct cactgagagc 1380  
 cgcttctcca accacgaat gcactacca gccacctta cctacacccc gccagtcacg 1440  
 tcaggcatgt ccctcgcat gtccgccacc actcactacc acacgtacct gccaccacc 1500  
 taccggcgt cttcccaaag ccagagtga ccttccaga ccagcagcac tccatatctc 1560  
 tactatggtc cttcgtcagc atcctatcag ttccaatgg taccggggg agaccggtct 1620  
 cttccagga tgggtccacc atgcaccacc acctcgatg gcagcagct attaaatcca 1680  
 aatttgccta accagaatga tgggtgtgac gctgacggaa gccacagcag ttccccaact 1740  
 gtttgaatt ctagcggcag aatggatgag tctgtttggc ggccatatg a 1791

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 2

atgcttcatt cgcctcacaac ac

22

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 3

tctgtttggc ggccatattg a

21

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/015673

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61L27/00, A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61L27/00, A61K48/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), MEDLINE (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| Y         | JP 2001-519767 A (The Regents of the University of Michigan),<br>23 October, 2001 (23.10.01),<br>Full text<br>& WO 97/38729 A1 & AU 710386 B<br>& EP 892644 A1 & CN 1226835 A<br>& KR 2000005376 A        | 1-5                   |
| Y         | JP 3054634 B2 (The Regents of the University of Michigan),<br>14 April, 2000 (14.04.00),<br>Full text<br>& WO 95/22611 A2 & EP 741785 B1<br>& US 5763416 A & US 5942496 A<br>& US 5962427 A & AU 698906 B | 1-5                   |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
12 November, 2004 (12.11.04)

Date of mailing of the international search report  
30 November, 2004 (30.11.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/015673

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| Y         | WO 03/11343 A1 (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology),<br>13 February, 2003 (13.02.03),<br>Full text<br>& EP 1424082 A1                                  | 1-5                   |
| A         | JP 2002-515731 A (Mount Sinai Hospital Corp.),<br>28 May, 2002 (28.05.02),<br>Full text<br>& WO 97/17430 A1 & AU 9672746 A<br>& EP 862616 A1 & US 6464729 B1<br>& US 2002/0111695 A1 | 1-5                   |
| A         | JP 7-508988 A (Beilar Collage of Medisin),<br>05 October, 1995 (05.10.95),<br>Full text<br>& WO 94/01139 A1 & AU 684050 B<br>& EP 653943 A1  | 1-5                   |

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2004/015673

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61L 27/00, A61K 48/00

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61L 27/00, A61K 48/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), MEDLINE (STN)

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示  | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| Y               | JP 2001-519767 A (ザ リージェンツ オブ ザ<br>ユニバーシティー オブ ミシガン) 2001. 10. 23, 全文<br>&WO 97/38729 A1 &AU 710386 B<br>&EP 892644 A1 &CN 1226835 A<br>&KR 2000005376 A | 1-5              |
| Y               | JP 3054634 B2 (ザ リージェンツ オブ ザ ユニ<br>バーシティー オブ ミシガン) 2000. 04. 14, 全文<br>&WO 95/22611 A2 &EP 741785 B1<br>&US 5763416 A &US 5942496 A                      | 1-5              |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献  
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12. 11. 2004

国際調査報告の発送日

30.11.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

八原 由美子

4C

9261

電話番号 03-3581-1101 内線 3451

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |  |                  |
|-----------------------|--|------------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー*       | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示  | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
|                       | &US 5962427 A &AU 698906 B   |                  |
| Y                     | WO 03/11343 A1 (独立行政法人産業技術総合研究<br>所) 2003.02.13, 全文<br>&EP 1424082 A1  | 1-5              |
| A                     | JP 2002-515731 A (マウント・サイナイ・ホスピ<br>タル・コーポレイション) 2002.05.28, 全文<br>&WO 97/17430 A1 &AU 9672746 A<br>&EP 862616 A1 &US 6464729 B1<br>&US 2002/0111695 A1 | 1-5              |
| A                     | JP 7-508988 A (ベイラー・カレッジ・オブ・メディ<br>シン) 1995.10.05, 全文<br>&WO 94/01139 A1 &AU 684050 B<br>&EP 653943 A1   | 1-5              |



# 特許協力条約

PCT

特許性に関する国際予備報告 (特許協力条約第二章)

(法第 12 条、法施行規則第 56 条)  
[PCT36 条及び PCT 規則 70]

REC'D 15 SEP 2005

WIPO

PCT

|  |                                      |                           |
|--|--------------------------------------|---------------------------|
| 出願人又は代理人<br>の書類記号 PH-2275-PCT                            | 今後の手続きについては、様式 PCT/IPEA/416 を参照すること。 |                           |
| 国際出願番号<br>PCT/JP2004/015673                              | 国際出願日<br>(日.月.年) 15.10.2004          | 優先日<br>(日.月.年) 15.10.2003 |
| 国際特許分類 (IPC) Int.Cl. <sup>7</sup> A61L 27/00, A61K 48/00 |                                      |                           |
| 出願人 (氏名又は名称)<br>独立行政法人科学技術振興機構                           |                                      |                           |

- この報告書は、PCT35 条に基づきこの国際予備審査機関で作成された国際予備審査報告である。  
法施行規則第 57 条 (PCT36 条) の規定に従い送付する。
- この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 4 ページからなる。
- この報告には次の附属物件も添付されている。
  - ☒ 附属書類は全部で 1 ページである。
    - ☒ 補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関が認めた訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面の用紙 (PCT 規則 70.16 及び実施細則第 607 号参照)
    - ☐ 第 I 欄 4. 及び補充欄に示したように、出願時における国際出願の開示の範囲を超えた補正を含むものとこの国際予備審査機関が認定した差替え用紙
  - ☒ 電子媒体は全部で フレキシブルディスク 1 枚 (電子媒体の種類、数を示す)。  
配列表に関する補充欄に示すように、コンピュータ読み取り可能な形式による配列表又は配列表に関連するテーブルを含む。(実施細則第 802 号参照)

4. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

- ☒ 第 I 欄 国際予備審査報告の基礎
- ☐ 第 II 欄 優先権
- ☐ 第 III 欄 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- ☐ 第 IV 欄 発明の単一性の欠如
- ☒ 第 V 欄 PCT35 条 (2) に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- ☐ 第 VI 欄 ある種の引用文献
- ☐ 第 VII 欄 国際出願の不備
- ☐ 第 VIII 欄 国際出願に対する意見

|   |                              |             |
|---|------------------------------|-------------|
| 国際予備審査の請求書を受理した日<br>04.08.2005  | 国際予備審査報告を作成した日<br>31.08.2005 |             |
| 名称及びあて先<br>日本国特許庁 (IPEA/JP)<br>郵便番号 100-8915<br>東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号 | 特許庁審査官 (権限のある職員)<br>八原 由美子   | 4 C 9 2 6 1 |
| 電話番号 03-3581-1101 内線 3452   |                              |             |

様式 PCT/IPEA/409 (表紙) (2004 年 1 月)

## 第I欄 報告の基礎

1. この国際予備審査報告は、下記に示す場合を除くほか、国際出願の言語を基礎とした。

☐ この報告は、\_\_\_\_\_ 語による翻訳文を基礎とした。  
それは、次の目的で提出された翻訳文の言語である。

- ☐ PCT規則12.3及び23.1(b)にいう国際調査  
☐ PCT規則12.4にいう国際公開  
☐ PCT規則55.2又は55.3にいう国際予備審査

2. この報告は下記の出願書類を基礎とした。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に応答するために提出された差替え用紙は、この報告において「出願時」とし、この報告に添付していない。)

☐ 出願時の国際出願書類

☒ 明細書

第 1-20 \_\_\_\_\_ ページ、出願時に提出されたもの  
 第 \_\_\_\_\_ ページ\*、 \_\_\_\_\_ 付で国際予備審査機関が受理したもの  
 第 \_\_\_\_\_ ページ\*、 \_\_\_\_\_ 付で国際予備審査機関が受理したもの

☒ 請求の範囲

第 \_\_\_\_\_ 項、出願時に提出されたもの  
 第 \_\_\_\_\_ 項\*、PCT19条の規定に基づき補正されたもの  
 第 1, 4, 6-8 \_\_\_\_\_ 項\*、04.08.2005 付で国際予備審査機関が受理したもの  
 第 \_\_\_\_\_ 項\*、 \_\_\_\_\_ 付で国際予備審査機関が受理したもの

☒ 図面

第 1/12-12/12 \_\_\_\_\_ ページ/図、出願時に提出されたもの  
 第 \_\_\_\_\_ ページ/図\*、 \_\_\_\_\_ 付で国際予備審査機関が受理したもの  
 第 \_\_\_\_\_ ページ/図\*、 \_\_\_\_\_ 付で国際予備審査機関が受理したもの

☒ 配列表又は関連するテーブル

配列表に関する補充欄を参照すること。

3. ☒ 補正により、下記の書類が削除された。

☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☒ 請求の範囲 第 2, 3, 5 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図  
☐ 配列表(具体的に記載すること) \_\_\_\_\_  
☐ 配列表に関連するテーブル(具体的に記載すること) \_\_\_\_\_

4. ☐ この報告は、補充欄に示したように、この報告に添付されかつ以下に示した補正が出願時における開示の範囲を超えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c))

☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図  
☐ 配列表(具体的に記載すること) \_\_\_\_\_  
☐ 配列表に関連するテーブル(具体的に記載すること) \_\_\_\_\_

\* 4. に該当する場合、その用紙に“superseded”と記入されることがある。

第V欄 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

|                |       |           |   |
|----------------|-------|-----------|---|
| 新規性(N)         | 請求の範囲 | 1, 4, 6-8 | 有 |
|                | 請求の範囲 |           | 無 |
| 進歩性(I S)       | 請求の範囲 | 1, 4, 6-8 | 有 |
|                | 請求の範囲 |           | 無 |
| 産業上の利用可能性(I A) | 請求の範囲 | 1, 4, 6-8 | 有 |
|                | 請求の範囲 |           | 無 |

## 2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

国際調査報告において、以下の文献が提示された。

文献1: JP 2001-519767 A

文献2: JP 3054634 B2

文献3: WO 03/11343 A1

文献1、2には、それぞれ、骨・軟骨再生を促す因子の遺伝子を導入したアデノウイルスベクターまたはレトロウイルスベクターを含む生体適合性材料からなるインプラントが記載されている。また、同文献には、生体適合性材料が、ハイドロキシアパタイト、リン酸三カルシウム、コラーゲン、ポリ乳酸、及びポリグリコール酸、ならびにこれらの2種以上で構成される複合体からなる群より選ばれるいずれかであることについても記載されている。

一方、文献3には、骨・軟骨誘導性転写因子の遺伝子を導入した細胞を用いた骨・軟骨組織の作製方法に関し、C b f a l 遺伝子を導入した細胞を in vitro で培養してから多孔性セラミックス等の足場材料とともにインプラントとして患部に適用することが記載されている。

文献1～3のいずれにも、C b f a l 遺伝子を導入したウイルスベクターを含む生体適合性材料をインプラントとして利用して、生体内で細胞にC b f a l 遺伝子の継続的導入を行う点に関し、開示されていない。

したがって、本国際出願請求の範囲1, 4, 6-8に記載のものは、文献1～3に対して、新規性も進歩性も有する。

配列表に関する補充欄

第 I 欄 2. の続き

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際予備報告を作成した。

- a. タイプ ☒ 配列表  
☐ 配列表に関連するテーブル
- b. フォーマット ☐ 書面  
☒ コンピュータ読み取り可能な形式
- c. 提出時期 ☐ 出願時の国際出願に含まれる  
☒ この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された  
☐ 出願後に、調査又は予備審査のために、この国際機関に提出された  
☐ \_\_\_\_\_ 付で、この国際予備審査機関が補正\*として受理した

2. ☒ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：

\*第 I 欄 4. に該当する場合、差替える配列表又は配列表に関連するテーブルに“superseded”と記入されることがある。

請 求 の 範 囲

1. (補正後) 骨誘導性転写因子 Cbfa1 の遺伝子を導入したアデノウイルスベクター又はレトロウイルスベクターを含む生体適合性材料からなるイン  
5 プラント。
2. (削除)
3. (削除)
4. (補正後) 生体適合性材料が、ハイドロキシアパタイト、 $\alpha$ -TCP、 $\beta$ -TCP、コラーゲン、ポリ乳酸、ヒアルロン酸、及びポリグリコール酸、  
10 ならびにこれらの2種以上で構成される複合体からなる群より選ばれるいずれかである、請求項1に記載のインプラント。
5. (削除)
6. (追加) 生体適合性材料がハイドロキシアパタイト、 $\beta$ -TCP、またはD、D-L、及びLポリ乳酸から合成された合成ポリマーコンポジットから  
15 なる多孔体である、請求項4に記載のインプラント。
7. (追加) 生体適合性材料が $\beta$ -TCP多孔体である、請求項6に記載のインプラント。
8. (追加) アデノウイルスベクター又はレトロウイルスベクターが生体適合性材料に吸着されている、請求項1、4、6、および7のいずれか1項  
20 に記載のインプラント。